

Hoofdstuk VIII

Studie van de heterotrofe bacteriën van de oppervlakte-sedimenten uit de Noordzee

door

A. BOEYE *

1.- Kwantitatieve studie van de heterotrofe bacteriënbevolking

1.1.-

Een vergelijkende studie van titratiemethodes voor heterotrofe kiemen uit zeeslikken werd ondernomen. Volgende punten werden onderzocht :

- Invloed voor het invriezen en bewaring bij zeer lage temperaturen op de titer (aantal kolonievormers per kubiek centimeter slik). Dit was nodig omdat de slikmonsters tijdens de croisières slechts uitzonderlijk aan boord konden behandeld worden.

- Keuze van een methode voor het homogeniseren van het slik.

- De manier van inoculeren van de vaste voedingsbodems. Twee methodes werden in uitgebreide proefnemingen vergeleken. De uitstrijkmethode bleek constant hogere titers te geven dan het inbedden in zachte agar. Tabel 1 vat de resultaten samen.

* met de medewerking van M. WAYENBERGH (deel 1) en M. AERTS (delen 2-5) en de technische hulp van M. DE PELSMAEKER (delen 1-2) en G. CLERX (delen 3-5).

Tabel 1

Comparison of streak and pour-plate inoculation. For each sample dilution, 4 plates were seeded simultaneously : 2 by streaking and 2 by pour-plating (marine agar, aerobic). S, P : Mean log T by streak and pour-plate inoculation, respectively; T : titre = colony formers/cm³ soil.

Sampling region	July			September			October			Globalized data			
	No. of samples	S	P	No. of samples	S	P	No. of samples	S	P	No. of samples	S	P	S - P
Inshore (<30 km) (B)	9	4.09	3.16	11	4.38	3.53	3	4.80	4.69	23	4.32	3.54	+0.78
Offshore (>30 km) (C)	13	3.16	2.05	10	3.14	1.91	8	3.37	2.68	31	3.21	2.17	+1.04
Grand mean		3.48	2.50		3.79	2.76		3.76	3.23		3.68	2.75	
Difference due to method = S - P			+0.98			+1.03			+0.53			+0.93	
Standard error of difference												0.19	

1.2.-

Het overwegend obligaat aëroob karakter van de heterotrofe bacteriëbevolking werd aangetoond door twee soorten proeven :

- Aëroob en anaëroob incuberen van duplicata platen (resultaten zie tabel 2).

Tabel 2

Aerobic versus anaerobic incubation for samples collected during July, 1972 cruise. Each sample dilution was streak-inoculated onto 4 marine agar plates, 2 of which were incubated aerobically and 2 anaerobically.

Sampling region	Mean log T			
	Sam- ples (a)	Aero- bic (a)	Anaer- obic (an)	Differ- ence a - an
Scheldt Estuary (A)	1	4.26	3.49	+0.77
Inshore (<30 km) (B)	9	4.09	2.84	+1.25
Offshore (>30 km) (C)	13	3.14	2.06	+1.08
Grand mean		3.56	2.42	+1.14
Standard error of difference				0.28

- Transfer van isolaten uit aëroob geïncubeerde platen naar platen, die dan anaëroob geïncubeerd werden, en omgekeerd. Uit de proeven bleek dat meer dan 90 % van de isolaten obligaat aëroob waren.

1.3.- Geografische- en seizoenvariatiies in de bacteriële bevolkingsdicht-
heid

Tabel 3

Regional differences : comparison of 3 sampling regions. NS : n° of samples;
P : mean log T by pour-plate inoculation (marine agar, aerobic incubation).

Sampling region	Jan.		March		April		July		Sept.		Oct.		Globalized data		Difference of mean (w) and standard error of difference		
	NS P		NS P		NS P		NS P		NS P		NS P		Standard deviation				
Scheldt Estuary (A)	1	5.18	8	4.81	-	-	1	3.99	-	-	5	4.17	15	4.57	1.14	(A) - (B) +1.32	0.34
Inshore (<30 km) (B)	3	3.48	9	2.32	6	3.27	9	3.16	11	3.53	3	4.69	41	3.25	0.80	(B) - (C) +1.05	0.23
Offshore (>30 km) (C)	5	2.46	19	2.08	8	2.41	13	2.05	10	1.91	8	2.68	63	2.20	0.64		
Monthly average		3.10		2.75		2.78		2.57		2.76		3.52		2.86			

Tabel 4

Seasonal variation. Titration (pour-plating on marine agar, aerobic) of samples collected at the same location in successive 1972 cruises.

Sampling region	January versus July ^a			July versus October ^a		
	Common sampling points	Mean log T		Common sampling points	Mean log T	
		January	July		July	October
Scheldt Estuary (A)	1	5.18	3.99	1	3.99	4.52
Inshore (<30 km) (B)	2	3.51	3.14	3	3.23	4.69
Offshore (>30 km) (C)	5	2.46	1.82	7	2.03	2.77
Grand mean		3.06	2.32		2.54	3.45
Difference of mean		-0.74			+1.09	
Standard error of difference ^b		0.15 (0.56)			0.18 (0.40)	

^aComparison of January and October results is omitted because only 2 sampling locations were common to these cruises.

^b Computed after normalisation of data of the 3 sampling regions to the same grand mean in order to cancel out regional differences. Parentheses: no normalisation.

Het bemonsteringsgebied werd voor de statistische behandeling opgesplitst in 3 gebieden : het Schelde-estuarium (A), het gebied tot 30 km van de kust (B) en het gebied op meer dan 30 km (C). De titers waren gemiddeld zeer laag in C, ruwweg 10 maal hoger in B en nogmaals 10 maal hoger in A (tabel 3). De opsplitsing per seizoen (tabel 3 en 4) toonde een minimum in de zomer (maart-september) in vergelijking met januari en oktober.

2.- Samenstelling van de heterotrofe bacteriënvolk

2.1.-

Uit de grondige studie van enkele slikmonsters bleek dat in elk monster tientallen verschillende soorten aërobe, heterotrofe bacteriën aanwezig waren. Zo bijvoorbeeld behoorden 74 isolaten afkomstig van één slikmonster tot niet minder dan 33 verschillende types. Tabel 5 illustreert de verdeling over verschillende taxonomische groepen. De

Tabel 5

Distribution among major taxonomic groups and tentative identification of 47 different bacteria from 3 sediment samples

Group	No. of species ^a	Genus, tentative ^b
Actinomycetales	1	<i>Micromonospora</i> sp.
Sporulating Gram-positive rods	16	<i>Bacillus</i> spp.
Nonsporulating		
Gram-positive rods	6	5 <i>Brevibacterium</i> spp., 1 unidentified
Cocci	5	<i>Micrococcus</i> spp.
Gram-negative rods	8	2 <i>Achromobacter</i> spp., 4 <i>Flavobacterium</i> spp., 2 unidentified
Gram-negative pleomorphic	11	Unidentified

a : as defined by tests listed in table 6.

b : according to determinative key of Skerman (1967).

overvloedigheid van *Bacillus* sp. en de moeilijkheden bij de soortidentificatie was richtinggevend voor de verdere ontwikkeling van het werk (§ 2 - 5).

2.2.-

Een uitvoerige fysiologisch-biochemische studie van 71 isolaten werd uitgevoerd. De resultaten zijn in tabel 6 verzameld.

Tabel 6

Physiological and biochemical properties of 71 isolates. Act : Actinomycetales; Bac : *Bacillus* spp.; G+ : non-sporulating Gram-positive rods; C : cocci; G- : Gram-negative rods; G-p : Gram-negative pleomorphic.

Test	Act (3)	Eubacteria					Total and % positive	
		Bac (41)	G+ (6)	C (8)	G- (8)	G-p (5)	Total	%
NaCl tolerated:								
10%	1	29	4	7	2	3	46	65
20%	0	11	2	3	0	3	19	27
30%	0	0	1	1	0	0	2	3
Growth at:								
4°C	2	23	4	4	7	3	43	61
18°C	3	41	6	8	8	5	71	100
30°C	3	41	6	8	7	5	70	99
44°C	2	34	4	3	4	5	52	73
65°C	0	21	2	1	1	0	25	35
70°C	0	11	0	1	0	0	12	17
75°C	0	7	0	0	0	0	7	10
Motility (agar diffusion)	1	21	1	0	1	0	24	34
Anaerobic growth (Hugh-Leifson)	0	27	2	3	1	3	36	51
H ₂ S production	0	4	0	1	0	0	5	7
NH ₃ from peptone	1	29	4	3	2	1	40	56
Indole production	0	0	0	0	0	0	0	0
Methyl red	0	10	1	0	0	1	12	17
Voges-Proskauer	0	17	1	1	0	0	19	27
Citrate (alkalinization)	1	8	0	0	1	0	10	14
Nitrate reduction	1	33	4	4	5	1	48	68
Catalase (10% H ₂ O ₂ method)	2	34	5	8	3	1	53	75
Oxidase	2	24	3	1	4	5	39	55
Lecithinase (egg yolk)	1	24	0	5	0	0	30	42
Esterase (Tween 80)	1	17	2	6	3	0	29	41
Phosphatase	2	31	4	6	8	4	55	77
Urease	1	4	2	3	1	2	13	18
Litmus milk alteration	3	38	2	5	3	3	54	76
Casein digestion	2	36	1	5	3	0	47	66
Gelatin liquefaction	1	34	3	4	3	0	45	63
Agar liquefaction	1	0	0	0	0	0	1	1
Starch digestion	2	21	0	2	4	0	29	41
Acid from glucose (NH ₄ ⁺)	0	19	1	1	1	0	22	31
Acid from glucose (peptone)	0	34	1	2	0	0	37	52
Gas from glucose (NH ₄ ⁺ or peptone)	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3.-

Indicatoren van faecale pollutie werden opgezocht in de slikmonsters. Coliforme organismen waren zeldzaam en de faecale *E. coli* nog veel zeldzamer. De resultaten zijn zijn samengevat in tabel 7. Voor een discussie van de resultaten uit delen 1 en 2 zij verwezen naar Boeyé *et al.* (1975).

Tabel 7
Occurence of coliform bacteria and *Escherichia coli*

Sampling region	Proportion of probes positive for coliform organisms ^a												Positives for <i>E. coli</i> , cumulative (10 cm ³)
	January, probe volume (cm ³)			March, probe volume (cm ³)			April, probe volume (cm ³)			Cumulative, probe volume (cm ³)			
	10	1.0	0.1	10	1.0	0.1	10	1.0	0.1	10	1.0	0.1	
Scheldt Estuary (A)	1/1	1/1	1/1	8/8	7/8	5/8	-	-	-	9/9	8/9	6/9	2/9
Inshore (<30 km) (B)	3/4	3/4	1/4	9/10	4/10	1/10	5/6	4/6	2/6	12/20	7/20	3/20	1/20
Offshore(>30 km) (C)	2/8	0/8	0/8	3/19	2/19	0/19	2/8	1/8	0/8	7/35	3/35	0/35	0/35

^aNumber of positive samples/total number of samples.

3.- Numerieke taxonomie van *Bacillus*-isolaten : groepsvorming

3.1.-

Uit 19 slikmonsters werden over een periode van meer dan twee jaar enkele honderden kiemen lukraak geïsoleerd. De isolaten behorend tot het genus *Bacillus* werden opgezocht. Na uitzuivering van de duplicaten bleven 138 *Bacillus*-isolaten over voor verder onderzoek.

3.2.-

Deze kiemen werden onderworpen aan ca 120 verschillende morfologische, fysiologische en biochemische testen. Vele van deze testen werden na enige tijd echter weer verlaten voor een van volgende redenen :

- resultaten onduidelijk of weinig reproduceerbaar,
- resultaten eenvormig of bijna eenvormig (geringe informatie-inhoud),

Tabel 8

Description of centrotype strains

Abbreviations : + positive ; \pm slightly positive ; - negative ; C central ;
 circul., circular ; filam., filamentous ; glist., glistening ; granul., granular ;
 irreg., irregular ; ST subterminal ; V variable

Phenon Centrotype strain no	A1 211	A2 72	B1 231	B2 73	B3 149	B4 33
<u>Morphology of vegetative cells</u>						
Average length in μm § <u>a</u>	4.1	2.4	3.5	5.1	3.5	3.8
Average width in μm § <u>a</u>	0.8	0.6	0.8	0.9	1.6	0.6
Chains of 4 or more cells in NB §	+	-	+	+	+	-
Ghosts in old NB culture §	+	+	+	+	+	+
Constancy of gram + reaction	+	+	+	+	+	+
Lipid droplets in cytoplasm § <u>b</u>	-	-	+	+	-	+
Motility § <u>c</u>	+,+	+,+	+,+	-,+	-, -	+,+
Flagella § <u>d</u>	+	+	+	+	+	+
<u>Spores and sporangia</u>						
Spore morphology : shape	oval	oval	oval	oval	oval	oval
position, wall thickness §	ST,thin	V,thin	V,thin	C,thin	C,thin	V,thin
Sporangium, average length in μm § <u>a</u>	2.8	2.0	2.1	1.9	2.3	2.3
bulging, chain formation §	-, -	-, -	-, -	-, -	-, +	-, -
% spores after 10 days in NB §	12 %	25 %	5 %	27 %	20 %	47 %
Spores killed at 80°, at 100° § <u>e</u>	-, -	-, -	-, +	-, +	-, +	-, +
<u>Macroscopic morphology</u>						
Colonies on MA : shape	irreg.	circul.	circul.	circul.	circul.	circul.
margin §	filam.	entire	entire	entire	entire	entire
elevation	raised	raised	convex	flat	flat	flat
brilliance §	dull	glist.	glist.	glist.	glist.	glist.
opacity §	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque
color	pink	white	yellow	orange	orange	orange
color intensity § <u>t</u>	faint	faint	faint	medium	medium	faint
Diameter (mm) of standard colony § <u>f</u>	20	7	13	10	8	7
Growth in NB : turbidity	\pm	\pm	\pm	+	-	-
sediment	fine	granul.	granul.	fine	fine	granul.
pellicle §	+	+	-	-	-	-
<u>Tolerances for growth in NB</u>						
Growth promoted by 3.5 % NaCl §	-	-	-	-	-	-
NaCl tolerated § <u>t</u>	10 %	10 %	10 %	15 %	30 %	20 %
Growth in 5 days in NB at pH 5.7, 30° § <u>t</u>	+	+	-	-	+	-
Growth at pH 6.0, 60° § <u>g</u>	-	+	-	+	-	-
Maximum growth t° in NB (7 days) § <u>t</u>	57°C	57°C	37°C	57°C	44°C	70°C

<u>Substrate utilisation and modification</u>						
Anaerobic growth in glucose broth §†	+	-	-	-	-	-
Simmons' citrate : growth	+	+	+	-	-	+
alkalinization §†	-	-	-	-	-	-
Koser medium + fumarate : growth	+	+	+	-	-	-
alkalinization §† <u>h</u>	+	+	-	-	-	-
Litmus milk: coagulation in 28 days §†	+	+	+	+	+	+
peptonisation, reduction	+,+	+,+	+,+	+,+	+, -	-,+
acidification, alkalization	-, -	-, -	-, -	+, -	-, -	-, -
<u>Enzymic activities and products (other than acid)</u>						
Digestion of casein §† <u>i</u>	+	+	+	+	+	+
Liquefaction of gelatin §† <u>j</u>	+	+	+	+	+	+
Digestion of starch §† <u>i</u> , pectate §† <u>k</u>	+,+	-,+	-,+	-, -	-, -	+, -
Digestion of chitin §† <u>l</u>	+	-	-	-	-	-
Production of abundant catalase §† <u>m</u>	+	+	+	+	-	-
Production of oxidase §† <u>n</u>	+	-	+	+	+	+
Reduction of nitrate §† <u>o</u> , of nitrite §† <u>w</u>	+,+	+,+	-, -	+,+	-, -	-, -
Hydrolysis of egg yolk lecithin §† <u>i</u>	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of Tween 80 §† <u>p</u>	-	+	-	+	-	-
Decomposition of urea §† <u>q</u>	+	-	-	-	-	-
Hydrolysis of aesculin §† <u>r</u>	+	+	+	-	+	-
Production of indole <u>o</u> , of acetoin §† <u>y</u>	-,+	-,+	-, -	-, -	-, -	-, -
Production of hydrogen sulfide §† <u>i</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Fermentation of glucids</u>						
Methyl red test §† <u>o</u> , gas from glucids	-, -	+, -	-, -	-, -	-, -	-, -
Anaerobic Hugh-Leifson test : growth	+	+	-	+	-	-
acidification §† <u>s</u>	+	+	-	-	-	-
Acid from glucose (NH ₄ ⁺) §† <u>t</u>	+	+	+	-	-	-
Acid production from (peptone) <u>u</u>						
arabinose, dulcitol, fructose §†	-, -, +	-, -, +	-, -, +	-, -, +	-, -, +	-, -, +
galactose §†, glucose §†, glycerol §†	-, -, -	+, +, +	-, -, +	-, -, -	+, +, -	-, -, -
inositol, lactose §†, maltose §†	-, -, +	-, -, -	-, -, +	-, -, +	-, -, -	-, -, +
mannitol §†, mannose §†, raffinose	+, +, -	+, +, -	+, +, -	+, +, -	+, +, -	+, +, -
rhamnose, saccharose §†, salicin §†	-, +, +	-, +, +	-, +, +	-, +, -	-, +, +	-, -, -
sorbitol §†, starch §†, xylose §†	-, +, -	-, -, -	-, -, -	-, +, -	+, -, +	-, -, +
<u>Sensitivity to antibiotics <u>v</u></u>						
10 u penicillin §, 10 µg streptomycin §	5,2	13,5	10,4	13,5	17,6	19,7
30 µg kanamycin §, 30 µg terramycin §	6,2	6,3	5,5	8,5	8,7	8,6
30 µg novobiocin §	10	11	10	12	11	12

§ used in computation of similarity coefficients; † used in computation of positivity index.

a measured from photograph of cells in NB culture (vegetative) or MA colony (sporangia), average of 10 cells ; b cells grown on glucose agar, stained after Burdon (10) ; c by stab inoculation in 0.5 % agar (ref. 11-p. 292), and by phase contrast observation of young NB culture in hanging droplet ; d silver impregnation (23). This test was done only with strains scoring negative for one or both motility tests. The result was considered negative only if no flagella were observed in 3 independent preparations (B.anthraxis CIP A3 was used as a negative control) ; e in nutrient broth, duration of heating 20 minutes ; f isolated colonies (implanted by touch of inoculation needle) on MA after 10 days at 30° ; g ref. 26 ; h Koser medium (ref. 17, p. 5) supplemented with 0.2 % sodium fumarate and 1.5 % agar ; i ref. 11, p. 498 ; j in 14 days at 18°C, ref. 22, p. 55 ; k ref. 16 ; l ref. 25, p. 298 ; m gas produced by bacterial paste in contact with 10 % (w/v) H₂O₂, ref. 2, p. 260 ; n oxidation of tetramethyl-p-phenylene diamine, ref. 2, p. 261 ; o ref. 2, p. 259-262 ; p ref. 8 ; q Christensen medium (ref. 27, p. 277-278) ; r ref. 9, p. 60 ; s ref. 1,p. 60 ; t ref. 22, p. 54 ; u read daily for 5 days, 30°, ref. 11,p. 293 ; v average width in mm of inhibition rings on MA plate surrounding two 6 mm discs, each containing antibiotic as stated ; w ref.7, p.13 ; y Clark-Lubs medium, 5 days, 30°C, tested with 5 % α -naphthol and 40 % KOH (ref. 2, p. 260).

- resultaten met zekerheid voorspelbaar uit die van een reeds eerder uitgevoerde test,

- resultaten sterk gecorreleerd met die van een andere test.

Na deze uitzuivering werden 63 multistaat kenmerken overgehouden (lijst in tabel 8) voor numeriek taxonomisch onderzoek.

3.3.-

De eerste bewerking in deze verwerking bestond in het coderen van de gegevens op een manier die rekening hield met

- de gradatie van het antwoord op elke test,
- de voorspelbaarheid van het antwoord in bepaalde combinaties.

Voor elke kiem werden twee reeksen gecodeerde gegevens aangelegd (één multistaat en één equivalente, binaire reeks).

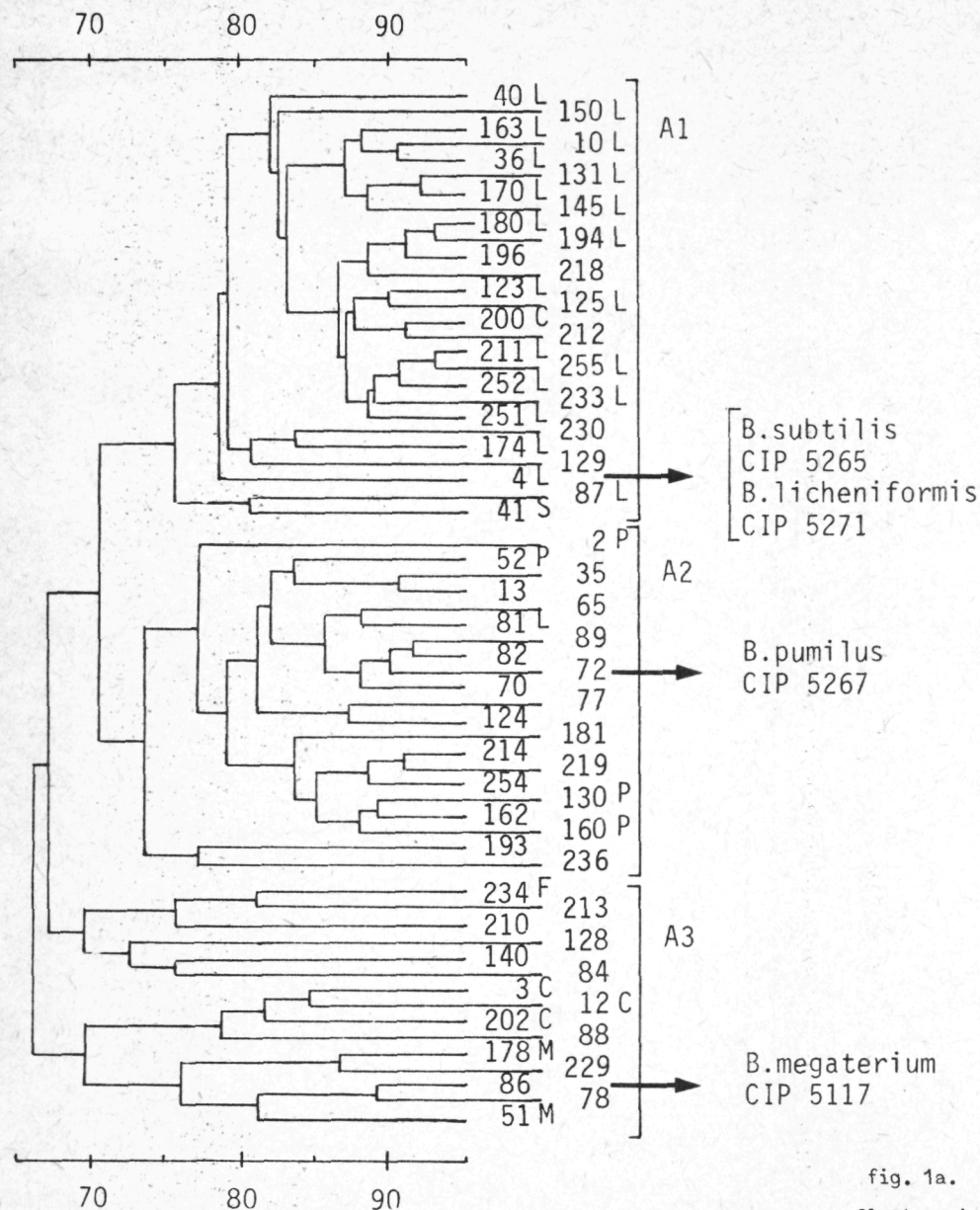


fig. 1.

Dendrogram, groups and species identification

Right to left : similarity scale and junctions; isolate no and species identification (C, *B. cereus*; F, *B. firmus*; L, *B. licheniformis*; M, *B. megaterium*; P, *B. pumilus*; S, *B. subtilis*); brackets giving limits of groups; reference strains shown next to most similar isolate.

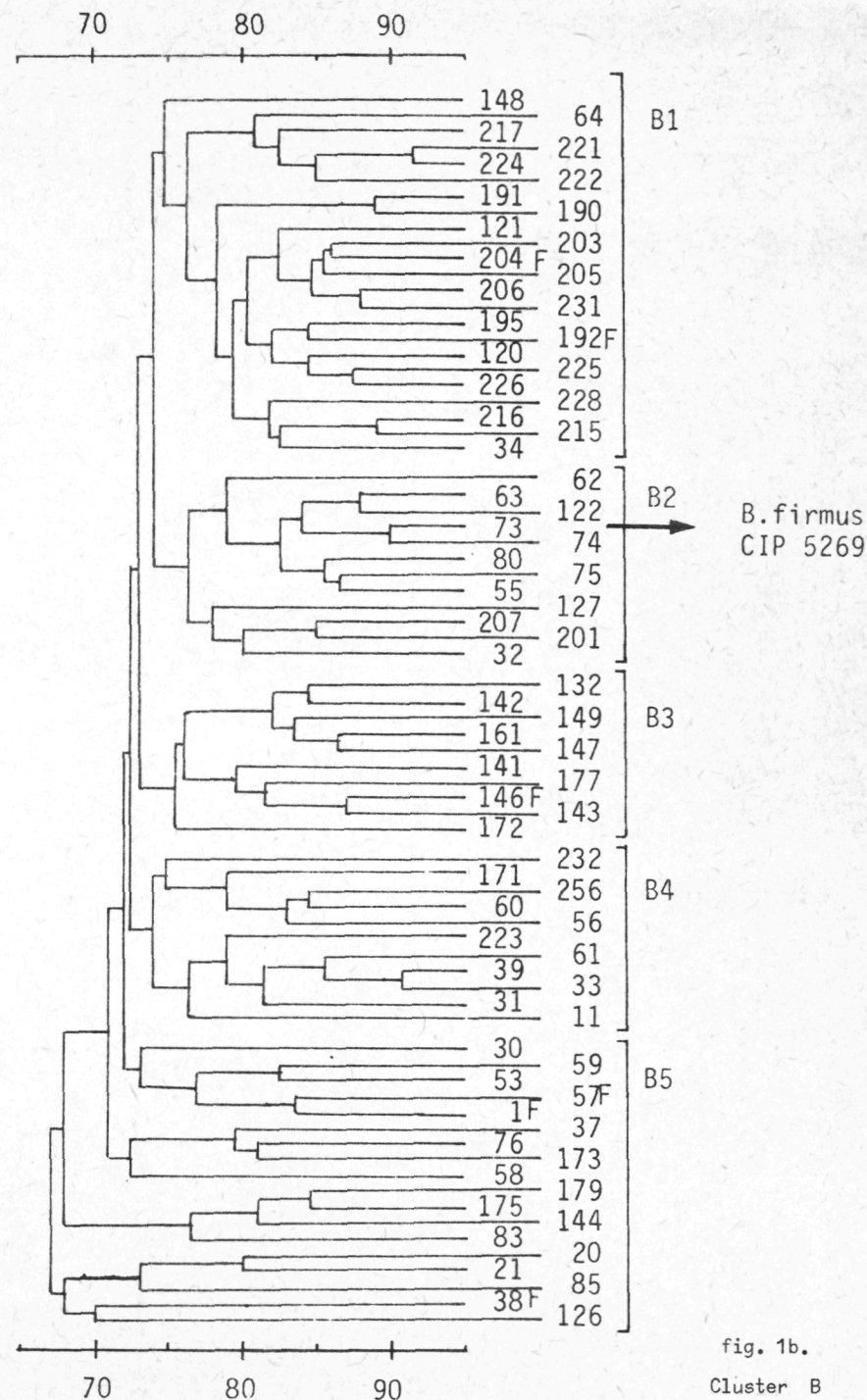


fig. 1b.

Cluster B

3.4.-

De reeksen werden met behulp van een computerprogramma twee aan twee vergeleken met berekening van de similariteitscoëfficiënt of "afstand" tussen elk paar stammen.

3.5.-

Op deze coëfficiënten werd een clusteringstechniek van het UPGMA (ongewogen paar-groep methode steunend op rekenkundige gemiddelden) toegepast. Uit de resultaten werd een geordend dendrogram opgesteld, waarin de verwantschap van de kiemen grafisch voorgesteld werd. Figuren 1a en 1b tonen dit dendrogram. Twee worden tot kleinere fenonen.

Tabel 9

Intra- and intergroup average similarities

a.	Cluster A	Cluster B
Cluster A (63 strains)	<u>71.9</u>	
Cluster B (74 strains)	62.8	<u>72.3</u>

b.	Cluster A			Cluster B				
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	B5
A1 (27 strains)	<u>82.0</u>							
A2 (21 strains)	70.5	<u>79.6</u>						
A3 (15 strains)	66.5	66.3	<u>68.1</u>					
B1 (23 strains)	62.2	68.2	68.6	<u>78.8</u>				
B2 (12 strains)	59.9	64.4	66.9	74.2	<u>79.4</u>			
B3 (10 strains)	61.1	67.4	65.4	73.6	72.3	<u>78.2</u>		
B4 (11 strains)	56.1	63.7	64.4	73.6	71.8	69.8	<u>76.4</u>	
B5 (18 strains)	55.1	62.4	63.3	69.6	69.6	69.5	69.0	<u>68.8</u>

Intragroup averages are underlined.

a. Main clusters

b. Groups as shown in fig. 1.

3.6.-

De gemiddelden der similariteitscoëfficiënten werden berekend :

- tussen alle leden van eenzelfde groep (intragroepsgemiddelde),
- tussen alle leden van verschillende groepen, waarbij de groepen 2 aan 2 werden genomen (intergroepsgemiddelde). De resultaten zijn te zien in tabel 9. Deze resultaten rechtvaardigen de groepsvorming in het dendrogram.

3.7.-

Binnen elk fenon werd het "centrotype" opgezocht, d.w.z. de stam die de grootste gemiddelde similariteit vertoonde met de overige leden van de groep. Een uitvoerige klassieke beschrijving van deze stammen wordt gegeven in tabel 8. Hun sporuleringsmorfologie wordt geïllustreerd in fig. 2.

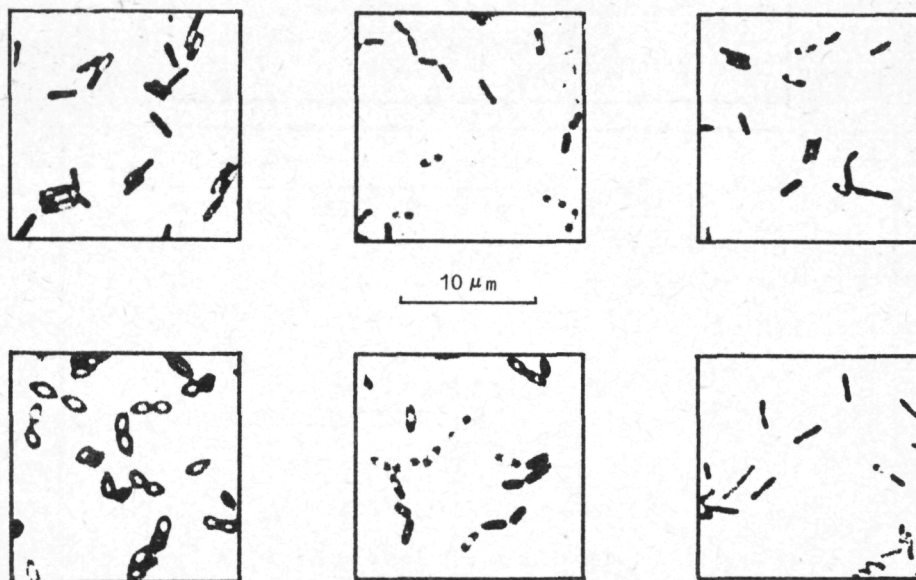


fig. 2.

Sporulation morphology of centrotypes strains

Top row, left to right (strain no and group) 211 (A1), 72 (A2), 231 (B1); bottom row 73 (B2), 149 (B3), 33 (B4). A complete description of these strains is given in table 2.

3.8.-

Er werd gezocht naar de meest discriminerende binair (ja-neen) testen voor elk fenon. De resultaten zijn gegeven in tabel 10. De eerste plaats kwam toe aan de Voges-Proskauer test (productie van acetoin). De twee hoofdgroepen bestonden bijna uitsluitend uit VP+, respectievelijk VP- stammen.

Tabel 10

Most discriminating binary tests

	Number of positive strains								Difference d in pro- portion of positive strains
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	B5	
Number of strains :	27	21	15	23	12	10	11	17	
a. Tests distinguishing clusters A and B (except marginal strains). $d = P_{A1+A2} - P_{B1+B2+B3+B4}$									
Acetoin produced (VP+)	27	21	5	0	0	0	0	1	1.00
Pellicle formed on NB	26	13	5	0	0	0	0	0	0.81
Pectate digested	25	20	5	6	0	0	1	0	0.81
Acid produced from salicin (peptone)	26	19	10	12	0	2	0	2	0.69
Motile (stab inoculation)	27	17	9	7	1	2	7	4	0.61
Spores retain viability after 20' at 100°	20	10	5	2	0	1	1	0	0.55
Growth at pH 5.7 (d=0.75, see section d); Hugh-Leifson test (d=0.57, see section b)									
b. Tests distinguishing phenons A1 and A2. $d = P_{A1} - P_{A2}$									
Starch digested	27	2	12	11	5	7	4	6	0.91
Penicillin disc : inhibition ring > 8 mm	4	21	2	21	11	9	8	14	0.85
Nitrite reduced	24	1	7	0	2	0	1	1	0.84
Chitin digested	21	0	5	0	0	0	0	1	0.78
Acid produced from maltose (peptone)	22	1	13	15	9	0	4	2	0.77
Colonies matte	20	0	0	0	3	4	0	0	0.74
Acid anaerobically produced (Hugh-Leifson)	24	4	5	1	0	0	0	0	0.70
Diameter of standard colonies ≥ 12 mm	22	3	5	8	6	3	0	3	0.67
Chains of 4 or more cells formed	22	3	12	22	12	9	4	13	0.67
Streptomycin disc : inhibition ring > 4 mm	5	17	9	16	11	9	11	14	0.62
Methyl red test positive	4	16	7	4	0	0	1	0	0.61
c. Tests distinguishing phenon B4 from B1 + B2 + B3 (pooled). $d = P_{B4} - P_{B1+B2+B3}$									
Acid produced from saccharose (peptone)	27	18	13	17	10	8	0	10	0.78
Pigmentation medium to intense	8	8	1	12	10	8	1	4	0.58
Acid produced from glucose (peptone)	27	21	15	22	12	8	4	10	0.57
Chains formed (d=0.59, see section b)									
d. Tests distinguishing phenon B3 from B1 + B2 (pooled). $d = P_{B3} - P_{B1+B2}$									
Growth in NB at pH 5.7, 30°	27	21	12	1	4	9	0	8	0.76
Lipid droplets present	4	2	11	13	11	0	10	5	0.69
Growth in NB at 44°	26	19	12	3	8	9	6	12	0.59
15 % NaCl tolerated	10	7	4	1	7	8	1	5	0.57
Acid from maltose (d=0.69, see section b).									
e. Tests distinguishing phenons B1 and B2. $d = P_{B1} - P_{B2}$									
Nitrate reduced	27	12	11	5	12	1	5	12	0.78
Anaerobic growth (Hugh-Leifson)	26	14	11	6	12	2	3	1	0.74

3.9.-

Het feit werd opgemerkt, dat de frequentie der positieve antwoord op testen, waarbij een of andere fysiologische of biochemische bekwaamheid werd nagegaan, van boven naar beneden in het dendrogram afnam

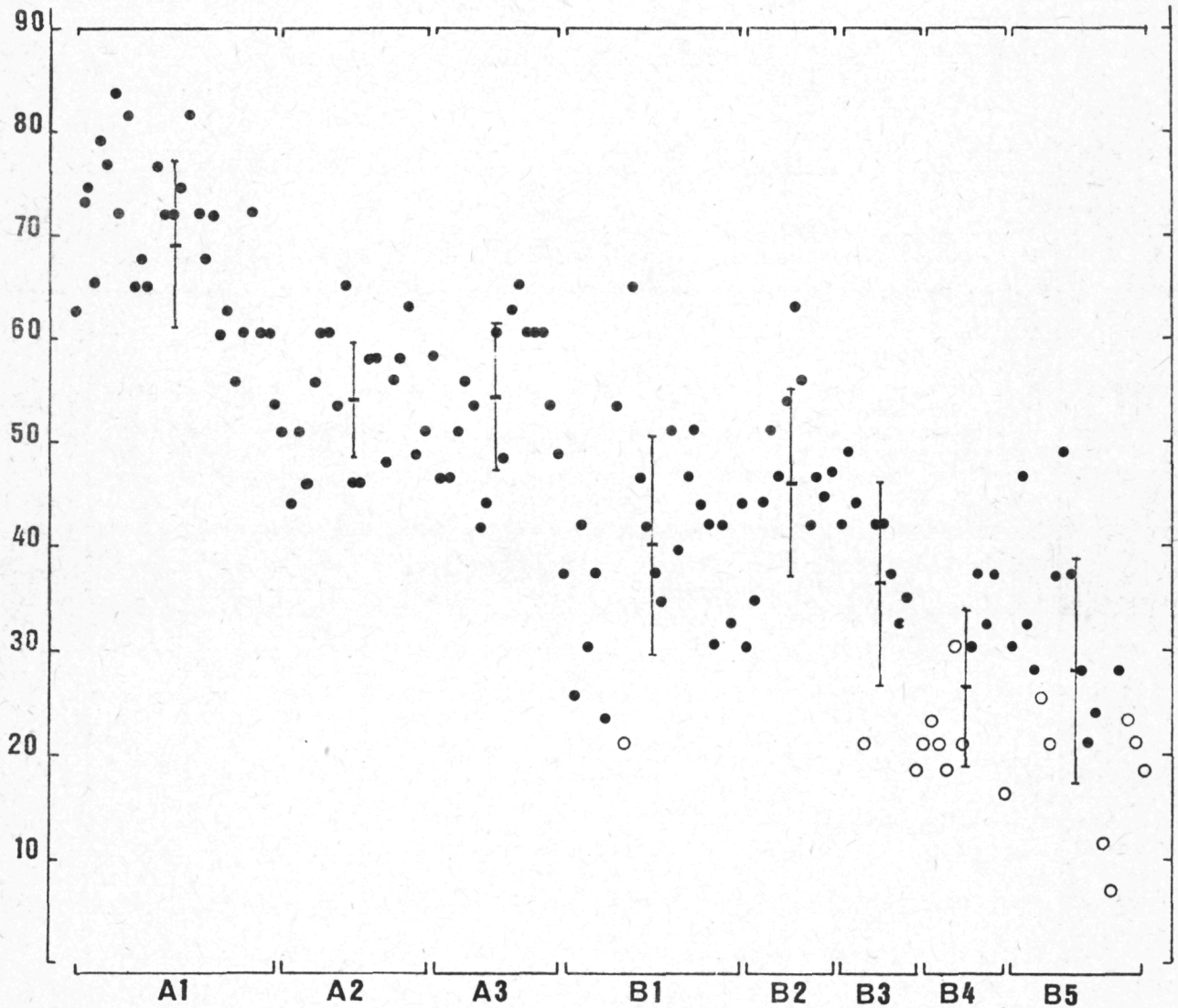


fig. 3.

Positivity index of individual strains and groups

Individual strains and groups (brackets) are ordered as in the dendrogram (fig. 1). Ordinate, percent of positive results of 43 tests denoting positive physiological and biochemical abilities. Filled circles, glucid fermenting strains; open circles, non-fermenting strains; bars and flags, group averages \pm standard deviation.

(boven = VP+, beneden = VP-groep). Een systematisch onderzoek van dit verschijnsel leidde tot het opstellen van de "positiviteitsschaal" weergegeven in fig. 3. Men raadplege deel 4 punt 5 voor een interpretatie hiervan.

4.- Vergelijking met de klassieke taxonomie en met een ander numeriek taxonomisch systeem

4.1.- Pogingen tot identificatie van de species volgens de klassieke methode

Deze pogingen toonden de mogelijke relevantie aan van een dozijn klassieke species. Type stammen van deze species werden betrokken uit een verzameling en gebruikt om de verdiensten van verschillende klassieke dichotomische tabellen empirisch na te gaan. De identificatiemethode die de minste fouten opleverde met de collectiekiemen bleek een combinatie van twee tabellen te zijn. Toepassing van deze methode op de eigen isolaten gaf min of meer resultaat naargelang het fenon.

In de VP+ groep (fig. 1a) werd een hoog percentage isolaten geïdentificeerd en kon fenon A1 in zijn geheel als *Bacillus licheniformis* worden bestempeld. In de VP- groep konden slechts zeer weinig kiemen geïdentificeerd worden en de zeldzame identificaties leidden steeds tot de species *B. firmus*.

4.2.- Kritisch onderzoek van het klassiek speciesbegrip

De identificatiepogingen van eigen isolaten uit de VP lieten vaak niet toe te beslissen tussen de species *B. megaterium* en *B. firmus* die nochtans naar klassieke begrippen door een drietal wel omschreven eigenschappen "gescheiden" zijn. Daarom werd een statistische studie van de frequentie van de antwoorden op de 3 discriminante eigenschappen gemaakt. De resultaten (tabel 11) tonen de opmerkelijke overeenstemming met de

Tabel 11

Width >0.9 μ m	Lipid droplets	Growth at pH 5.7	Number of strains	
			Observed	Expected under null hypothesis
-	-	-	10	14.4
-	-	+	10	8.0
-	+	-	25	18.4
-	+	+	6	10.2
+	-	-	10	9.3
+	-	+	7	5.2
+	+	-	9	11.9
+	+	+	7	6.6

distributie berekend onder de nulhypothese (afwezigheid van elke correlatie). Dit resultaat toont de artificiële aard aan van de twee beschouwde conventionele species.

4.3.- Numeriek-taxonomische studie van collectiekiemen

Vertegenwoordigers van 12 klassieke species werden aan dezelfde reeks testen onderworpen als de eigen isolaten en hun plaats in het dendrogram werd bepaald. De resultaten zijn samengevat in fig. 1a en 1b en in tabel 12. Opvallend was dat slechts 5 uit de 12 een duidelijke plaats kregen. Deze plaatsingen bevestigden de reeds hoger vermelde identificatie van de eigen kiemen. Ze brachten eveneens de hoge similariteit van de type stammen van *B. subtilis*, *B. licheniformis* en *B. pumilus* aan het licht.

4.4.- Vergelijking van onze eigen taxonomie met die van Bonde (1974)

Deze onderzoeker publiceerde de eerste poging tot numerieke taxonomie van het genus *Bacillus*, gebaseerd op onderzoek van kiemen van uiteenlopende oorsprong. Hij kwam ertoe, tien fenomenen te onderscheiden. Wij

Tabel 12

Average similarity of 12 test strains representing conventional species

Test strain *	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	B5
<i>B.licheniformis</i>	<u>77.9</u>	65.4	64.3	59.3	62.3	60.5	56.1	57.4
<i>B.subtilis</i>	74.8	68.3	65.3	60.7	60.5	61.9	60.5	59.8
<i>B.pumilus</i>	74.5	<u>81.5</u>	65.2	66.4	62.2	65.1	65.7	61.1
<i>B.cereus</i>	71.2	66.3	<u>70.5</u>	67.7	71.0	67.1	64.5	63.3
<i>B.cereus</i> var. <i>mycoides</i>	71.0	64.4	65.0	61.9	64.9	59.4	60.4	57.0
<i>B.anthraxis</i>	63.5	64.7	69.8	67.9	71.1	64.7	67.5	66.1
<i>B.megaterium</i>	65.8	66.8	70.3	66.2	67.8	67.1	60.7	64.3
<i>B.firmus</i>	61.0	66.0	68.1	<u>74.6</u>	<u>74.9</u>	67.6	<u>75.6</u>	<u>70.0</u>
<i>B.brevis</i>	53.7	58.8	62.7	66.7	64.8	64.7	74.1	64.6
<i>B.pantothenicus</i>	62.1	63.4	65.8	66.9	66.9	64.4	68.4	63.4
<i>B.sphaericus</i>	52.1	64.1	61.8	66.9	60.5	<u>70.0</u>	68.1	65.9
<i>B.coagulans</i>	61.0	62.0	63.7	62.4	57.4	60.2	62.4	61.9

Underlined : highest figure in column.

* For origin and status of test strains, see 2.2.2.

bekwamen de tien centrotipe stammen en onderwierpen deze eveneens aan onze batterij testen. De resultaten waren in die mate teleurstellend, dat Bonde's tien centrotypes of helemaal afzijdig waren, of uitsluitend terechtkwamen in onze VP+ groep. Hieruit kan worden besloten dat onze VP- groep waarschijnlijk een groep kiemen voorstelt die, hoewel dominerend in de Noordzeeslikken, elders weinig vertegenwoordigd is. Een algemene gelijkenis op statistische grond kon evenwel worden aangetoond tussen onze VP+ en VP- groepen en twee van Bande's fenomenen (tabel 13).

4.5.- Vergelijking met Joly's positiviteitsprofielen

Deze Franse onderzoeker stelde naar 22 klassieke species een "gemiddeld profiel" op, dat verwant is met ons eigen positiviteitsbegrip (§ 3.9).

Tabel 13

Comparison of groups described in this paper and by Bonde

	A (this paper)	IIIA (Bonde)	B (this paper)	IIB (Bonde)
No of strains :	63	43	74	24
Chains formed	59	26	81	75
Cell width > 0.9 μ m	16	54	36	96
Pellicle formed	70	51	0	4
Nonmotile (phase contrast observation)	5	9	64	8
Lipid droplets present	27	9	53	42
VP+ (Clark-Lubs)	84	98	1	8
Nitrate reduced	79	98	47	67
Starch hydrolyzed	65	86	45	79
Pectate hydrolyzed	79	71	9	33
Anaerobic acid production (Hugh-Leifson)	52	88	1	33

Percentage of strains possessing 10 critical features.

De door ons gevonden positiviteitsgradiënt komt goed overeen met die van Joly voor wat betreft de relevante klassieke species.

Besluit uit delen 3 en 4 (voor een meer gedetailleerde formulering zij verwezen naar de als bijlage opgenomen, engelstalige *Discussion*) :

- irrelevant en grotendeels artificieel karakter van de klassieke species binnen het genus *Bacillus*. De klassieke taxa weigerden meestal dienst als het erom ging nieuwe, uit een natuurlijk biotoop lukraak geïsoleerde kiemen te identificeren;

- noodzaak van de creatie van nieuwe taxa;

- onze poging om dit te doen met behulp van numerieke taxonomie leidde tot de vorming van fenonen en de selectie van de Voges-Proskauertest als primair criterium;

- het werk leidde eveneens tot de vaststelling van het bestaan van een positiviteitsgradiënt samenvallend met het bekomen dendrogram.

5.- Taxonomie van *Bacillus* isolaten op grond van serologische verhoudingen

Hoewel serologische relaties een belangrijke rol spelen in de taxonomie van andere groepen bacteriën, is ons voor het genus *Bacillus* slechts één 15 jaar oude publicatie van Britse onderzoekers [Norris en Wolf (1961)] hierover bekend. In deze publicatie werd de species-specificiteit van de thermostabiele sporenantigenen aangetoond. Er was alleen kruisreactie tussen de species *B. subtilis* en *B. licheniformis*. Daar wij in de betrekkingen tussen de species van de *subtilis*-groep bijzonder geïnteresseerd waren (cf. § 4.3) ondernamen wij een studie van de type-stammen van voornoemde species. Dit werk liep om technische redenen (moeilijkheden bij het immuniseren van de proefdieren) grote vertraging op en kon niet afgewerkt worden. Toch zijn de voorlopige resultaten interessant in die zin dat ze de kruisreactie tussen *B. subtilis* en *B. pumilus* en de afwezigheid van kruisreactie tussen *B. licheniformis* en de overige twee bevestigen. Onze onderzoekingen zetten een stap verder dan die van Norris en Wolf, daar wij een techniek gebruikten (dubbele diffusie in agar) waarbij niet enkel de kruisreactie, maar ook de eventuele identiteit van de antigenen kan worden onderzocht. Zodoende kon worden aangetoond dat het sporenantigeen van *B. subtilis* in feite bestond uit tenminste twee antigenen, waarvan één reageerde met antiserum tegen *B. pumilus* sporen.

Hopelijk zal dit uiterst interessant, maar laattijdig bekomen resultaat het vertrekpunt van verder onderzoek kunnen vormen.

6.- Verwante research buiten het kader van het ICWB programma

In het vorige hebben wij ons strikt beperkt tot de onderzoekingen die werden uitgevoerd met medewerking van personen aangesteld in het kader van het ICWB programma. In het laboratorium werden echter ook

andere onderzoeken over dezelfde problematiek verricht, namelijk :

- "Vergelijking van methoden voor staalname van slib bij bacteriologisch onderzoek", door J.-M. BESSEMANS, einde-studie-werk 1973;
- "Taxonomisch onderzoek van twee kiemen op genetisch vlak door guanine-cytosine gehalte bepaling", door B. LE CLEF, einde-studie-werk 1974;
- "De thermische behandeling als middel ter bepaling van de relatieve hoeveelheid sporen in mariene slikken", door B. VAN DESSEL, einde-studie-werk 1974;
- "Studie van enkele koolstofbronnen in verband met de numerieke taxonomie van *Bacillus* sp.", door I. STOOPS, einde-studie-werk 1974;
- "De gevoeligheid voor antibiotica als hulpmiddel bij de numerieke taxonomie van *Bacillus* species", door J. GOOSSENS, einde-studie-werk 1974 (publicatie in voorbereiding);
- een voorbereidende studie in samenwerking met een navorser van U.I.A. is aan gang om het mogelijk gebruik te onderzoeken van het polypeptide electroferogram als bijkomend taxonomisch criterium bij *Bacillus* sp.

7.- Discussion

Bacillus strains tend to exhibit "a graduated series of differences like the gradations of a spectrum in which colors fade into one another in sequence" (15). In addition, "all too often, the determination of a strain is impossible either because the currently accepted species are too poorly defined or because the distance to these species is excessive" (4). This state of affairs calls for the creation of more hospitable taxa. If these are to be defined by the method of numerical taxonomy, it is, however, essential that :

- i) a highly diversified and balanced set of nonredundant tests be used and

ii) the strains under investigation be drawn (preferentially at random) from natural habitats and certainly not from collections of named strains.

The present study of 138 random isolates from marine sediments satisfies these criteria. Two clusters A and B emerged, which differed by many features and most sharply by the Voges-Proskauer test. Except for a few marginal elements, all strains of cluster A were VP+ and all strains of B were VP-. In our hands, the Voges-Proskauer test was perfectly reproducible, provided due allowance was made for slow producers.

Cluster A contained two tight phenons, one of which corresponded to the conventional species *B. licheniformis*. A few strains of cluster A were found to belong to five other species.

Cluster B contained only a few identifiable strains, all of which were *B. firmus*. All the species that turned up belonged to group I of Smith *et al.* (20); since nearly all the unidentified strains also had oval non-bulging spores, they also belonged to that group.

In a monumental study of mesophilic *Bacillus* isolates of different origins, Bonde (6,7) described 10 phenons, most of which were also unrelated to conventional species. Our own phenons could not be equated to any of these, though there was a general statistical resemblance between our clusters A and B, and Bonde's phenons IIIA and IIB, respectively. From the relative morphological homogeneity noted above, and the many invariant physiological characters of our isolates (3.1), it may be concluded that the aerobic, sporulating rods one can isolate from North Sea sediments cover a relatively small area of the *Bacillus* spectrum.

On the other hand, our isolates differed widely by the extent of their biochemical abilities. As shown in figure 3, a gradient of positivity (as measured by the proportion of positive answers to more than 40 physiological and biochemical tests), could be superimposed upon the dendrogram.

Our findings can be compared to those of Joly (18) who established a "theoretical average profile" of 22 *Bacillus* species based on the final results of 83 biochemical tests and the time required for those results to become positive. Disregarding the time factor, we used Joly's data to compute the percentage of positive tests for the species relevant to the present work. The score of *B. licheniformis* (55 % positive) was roughly double of that of *B. firmus* (27 %). Similarly, the positivity index of 69 % obtained in the present work for phenon A1 (fig. 3) which corresponded to *B. licheniformis*, was about double that of cluster B (35 %) which was related to *B. firmus*. Both Joly's and our own findings suggest that *Bacillus* taxa, whether conventional or numerical, may be ranked by an index of positivity. This index may perhaps turn out to be the unifying concept or "wave length" of the *Bacillus* spectrum.

Looking at our data from another perspective, the coexistence in the same biotope of strains with very different biochemical capabilities also raises intriguing ecological problems.

Referenties

- BARJAC, H. de en BONNEFOI, A., (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*, *Entomophaga*, 7, 5.
- BARJAC, H. de en COSMAO-DUMANOIR, V., (1975). Intérêt de certains critères biochimiques supplémentaires pour la classification des souches de *Bacillus*, *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 126A, 83.
- BOEYÉ, A., WAYENBERGH, M. en AERTS, M., (1975). Density and composition of heterotrophic bacterial populations in North Sea sediments, *Marine Biol.* 32, 263.
- BOEYÉ, A. en AERTS, M., (1976). Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments, *Intern. J. Syst. Bact.*, (ter perse).
- BONDE, G.J., (1973). *The genus Bacillus*, ISS Research Council, series 2, Copenhagen.
- BONDE, G.J., (1975). The genus *Bacillus*, *Dan. Med. Bull.*, 22, 41.

- GORDON, R.E., (1973). *The genus Bacillus*, in A.I. LASKIN en H.A. LE-CHEVALIER (eds.), *Handbook of microbiology, vol. I, Organismic microbiology*, CRC Press, Cleveland, 71.
- GORDON, R.E., HAYNES, W.C. en PANG, C.N-H., (1973). *The genus Bacillus*, U.S. Dept. Agr. Handbook, 427, Washington D.C.
- JOLY, B., (1973). *Contribution à l'identification des espèces du genre Bacillus par l'étude normalisée des caractères enzymatiques; Intérêt en taxonomie*, thesis, Univ. of Clermond-Ferrand.